

Zur Kenntnis des morphologischen und chemischen Aufbaus von Bakterien-Zellwand und -Kapsel

Teildruck der
INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde, vorgelegt der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

SUSANNE GUEX-HOLZER

Basel



VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Zur Kenntnis des morphologischen und chemischen Aufbaus von Bakterien-Zellwand und -Kapsel

Teildruck der
INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde, vorgelegt der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

SUSANNE GUEX-HOLZER

Basel



VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Genehmigt von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. *J. Tomcsik* und Dr. *T. Reichstein*.

Basel, den 23. Juni 1953.

Prof. Dr. *P. Huber*
Dekan.

Frau *Susanne Guex-Holzer* wurde von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 23. Juni 1953 erlaubt, diesen Teildruck ihrer am 23. Juni 1953 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

*Zur Kenntnis des morphologischen und chemischen Aufbaus
von Bakterien-Zellwand und -Kapsel*

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Hygienischen Institut der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.



Änderung der Struktur der Bakterienzelle im Verlauf der Lysozym-Einwirkung.

Bei höheren Lysozymkonzentrationen kommt die Desintegration der empfindlichen Bakterien explosiv zustande (1), bei niedrigeren Lysozymkonzentrationen erfolgt hingegen, zunächst bei erhaltener Färbbarkeit, eine Quellung der Bakterienzelle, deren Rand allmählich unscharf wird; dann läßt die Färbbarkeit nach und es verbleiben nur noch undefinierbare Bakterien-Schatten (2). Nach *Meier* et al. (3, 4) werden die Mucoproteine an der Oberfläche der Bakterien durch Lysozym angegriffen, nach *Webb* (5) sollen aber auch die die Gram-Positivität bestimmenden Ribonucleinsäuren freigesetzt werden. Die ausführlichste Untersuchung über die Beeinflussung der Bakterienstruktur im Laufe der Lysozymeinwirkung stammt von *Welshimer* und *Robinow* (6), die die mit Formalin abgetöteten Bakterien unter standardisierten Bedingungen mit gereinigtem Lysozym behandelten und die Präparate zur mikroskopischen Untersuchung mit der Methode von *Klieneberger* fixierten, um die fixationsbedingte Distorsion der Bakterien auf ein Minimum herabsetzen zu können. Da sie mit *B. megatherium* arbeiteten, das zur Untersuchung der Struktur der Bakterienzelle vorzüglich geeignet ist, konnten sie nach Färbung mit Viktoria-Blau 4 R die Einwirkung des Lysozyms auch auf die Zellwand beobachten.

Wir begannen mit unseren Lysozymuntersuchungen, um die von uns mit immunochemischen Methoden nachgewiesene eigenartig komplexe Struktur der Kapsel des *Bac. megatherium*, bzw. des *Bac. «M»* (7, 8), und insbesondere die strukturelle Rolle der früher nicht beobachteten transversalen Septa der Kapsel erklären zu können. Wegen der speziellen Zielsetzung führten wir als erste Lysozymstudien mit unfixierten Bakterien im Phasenkontrastmikroskop durch, wobei zur Darstellung der Zellstruktur nicht die Färbung, sondern Antikörper verwendet wurden.

In dieser Arbeit wird über die Untersuchungen mit Bac. «M» (7, 8, 9, 10) einem im Laufe von Versuchen über induzierte Mutation des Bac. anthracis isolierten, dem B. megatherium nahestehenden Stamm berichtet.

Die Lysozym-Empfindlichkeit dieses Stammes wurde akzidentell im Laufe von Agglutinationsversuchen beobachtet. Die mit höherer Serumkonzentration (1 : 5) agglutinierte Bakterien-suspension zeigte nach 16 Stunden bei Zimmertemperatur eine deutliche Aufhellung. Da dieses Phänomen durch Inaktivierung des Serums nicht beeinflußt, hingegen durch Seitz Filtration aufgehoben wurde, dachten wir an Lysozymwirkung. Mit menschlicher Tränenflüssigkeit bzw. mit Eiklar wurden die Bakterien bereits in 30 Minuten aufgelöst. Die Lysozym-Empfindlichkeit des Bac. «M» ist ziemlich groß, da das Eiklar bis zu einer Verdünnung von 1 : 100 000 eine Bakteriensuspension von der Dichte des McFarland Standard Nr. 2 auflöste, wenn die Reaktion nach 2stündiger Inkubation im 50° C Wasserbad abgelesen wurde. n/300 HCl verhindert die Lyse, die aber nach Neutralisierung des Gemisches augenblicklich erfolgt; somit konnte das Alkaliphänomen nach *Nakamura* (2) ausgelöst werden. Wir beobachteten weiterhin, daß die «Vitalfärbung» der Bakterien mit Methylviolett das Alkaliphänomen verhindert.

Eine Besonderheit dieser Beobachtung im Gegensatz zu früheren Befunden besteht darin, daß die empfindlichen Bakterien diesmal bekapselt sind und eine komplexe, aus Mucopolysacchariden und aus Polypeptid aufgebaute, mit spezifischen Antikörpern morphologisch differenziert darstellbare Kapselstruktur aufweisen.

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Polysaccharid- bzw. Polypeptid-Antikörper wurde in unseren früheren Arbeiten beschrieben. Wenn einer dieser Antikörper gleichzeitig mit Lysozym der Bakteriensuspension zugesetzt wird, wird die Lyse zeitlich etwas verzögert, aber nicht wesentlich beeinflußt. In der Regel mischten wir in den systematischen Untersuchungen, in denen der zeitliche Verlauf der Lyse bei verschiedenen Eiklarverdünnungen morphologisch studiert wurde, eine Öse des Antikörper enthaltenden Serums erst unmittelbar vor der mikroskopischen Untersuchung auf dem Objektträger mit zwei Ösen des Lysozym-Bakterien-Gemisches. Die mit einem Deckglas abgedeckte Flüssigkeit wurde sofort mit dem Phasenkontrast-Apparat der Firma Wild, Heerbrugg (Objektiv H I 85, 1.25; Okular Nr. 10), welcher auf das Leitz-Ortholux-Mikroskop montiert war, untersucht. Die Mikrophotographie war insofern schwierig, als jeweils eine Stelle des Präparates ausgesucht werden mußte, wo keine durch Strömung bedingte Beweglichkeit zu beobachten war. Die verschie-

denen Stadien der Lysozymeinwirkung auf die Struktur der Bakterienzelle konnten optimal beobachtet werden, wenn die Konzentration des Eiklars in den bei Zimmertemperatur gehaltenen Bakterien + Lysozym-Gemischen 1 : 100 bis 1 : 1000 betrug und die Probeentnahme nach einer Inkubationszeit von 1, 5, 10, 20, 30, 60 Minuten, bzw. nach mehreren Stunden, erfolgte.

Zum Nachweis der strukturellen Veränderungen der Bakterienzelle infolge Lysozym-Einwirkung ergab das Polysaccharid-Immunserum weitaus aufschlußreichere Bilder; es sollen hier, der Kürze halber, nur diese wiedergegeben werden.

Abb. 1 zeigt, außer dem nicht differenzierten Bazillenkörper,



Abb. 1.



Abb. 2.

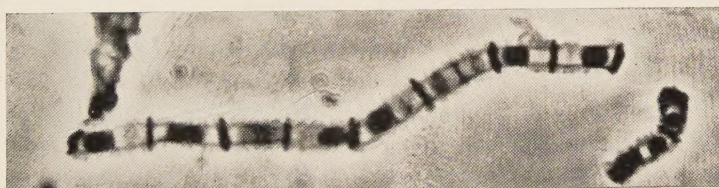


Abb. 3.



Abb. 4.



Abb. 5.



Abb. 6.

die Polysaccharid-Struktur der Kapsel vor der Lysozym-Einwirkung. Drei stark ausgebildete transversale Septa unterteilen die hier abgebildete Kette in vier Hauptglieder. Jedes Glied ist unterteilt durch ein schwach angedeutetes transversales Septum. Sonst wird das Kapselpolysaccharid durch gestrichelte Struktur am Rand der Kapsel sowie durch ganz auffallende gabelförmige Verstärkungen an beiden Enden der Kette gekennzeichnet. Keines dieser eigenartigen Elemente der Kapselstruktur ist sichtbar, wenn Polysaccharid-Antikörper nicht zugegeben oder diese aus dem Serum durch Zugabe des gereinigten Kapselpolysaccharids gebunden werden. Über die Herstellung und über die chemische Natur des gereinigten Polysaccharids wird anderswo berichtet.

Die Abbildungen 2—6 geben über einige Phasen der strukturellen Veränderungen dieser Bazillen Auskunft, die bei Zimmertemperatur infolge der Einwirkung von 1 : 100 Eiklar eingetreten sind.

Abb. 2: Zwei Minuten nach Lysozymzugabe sind die Bazillenkörper wesentlich breiter; die Enden der einzelnen Glieder zeigen eine deutliche Abrundung. An drei Stellen der Kette sind sichelförmige leere Stellen sichtbar, die auf die Trennung der Plasmamembran von der Zellwand hinweisen. Die Polysaccharid-Kapselstruktur wird nicht merklich verändert; sie bindet so viel Antikörper, daß nicht mehr genügend übrigbleibt, um die Zellwand deutlich sichtbar zu machen.

Abb. 3 stellt die Lysozymeinwirkung nach etwa 10 Minuten dar. Die Polysaccharidkapselstruktur ist größtenteils aufgelöst, infolgedessen finden die Polysaccharid-Antikörper Zugang zur inneren Struktur der Bakterien. Die gedehnte Zellwand wird durch die Polysaccharid-Antikörper in Form einer scharf ausgezogenen Linie dargestellt. Die mächtigen Querwände werden auch durch den Polysaccharid-Antikörper dargestellt, und es ist deutlich sichtbar, daß diese die Zellwand durchkreuzen und ihre direkte Fortsetzung in den transversalen Septa der Kapsel finden. Am Ende der Ketten sind die Reste der ursprünglich meistens gabel-, manchmal kuppenförmigen Verstärkungen sichtbar. Das Bakterienplasma zeigt zumeist eine vollständige sphärische Transformation.

Abb. 4 zeigt das gleiche Präparat wie Abb. 3 einige Minuten später. Die sphärische Transformation der Bazillen ist vollendet, manche dieser Gebilde sind bereits aufgelöst.

Abb. 5 demonstriert ein selten beobachtetes Phänomen: die Querwand weist eine Teilung auf. Die Polysaccharid-Zellwand-

Reaktion ist sehr deutlich, die Kapselstruktur ist vollkommen aufgelöst.

Abb. 6 zeigt die Lysozymwirkung nach 30 Minuten, wo die Zellwand noch mehr gedehnt ist, und wo die Polysaccharid-Antikörper nur eine verschwommene Struktur darzustellen fähig sind. Diese ausgelaugten Bazillenskelette werden durch den Polysaccharid-Antikörper, aber keinesfalls durch den Polypeptid-Antikörper, agglutiniert.

Die hier kurz geschilderte Lysozymwirkung schien uns deshalb von besonderem Interesse zu sein, da sie einen unerwarteten Einblick in die Struktur der Bakterienzelle ermöglichte. Die Trennung der Zellwand von der Plasmamembran kann durch Lysozymeinwirkung leicht erreicht werden. Es gelang unseres Wissens nach zum ersten Male, die von der Zellmembran getrennte Zellwand mittels Antikörperreaktion darzustellen. Ohne Einwirkung von spezifischen Antikörpern wäre die Zellwand dieser Bakterien auf der Mikrophotographie kaum sichtbar. Auch der Polypeptid-Antikörper (8) ist nicht imstande, die der Zellwand entsprechende, im Phasenkontrastmikroskop sehr schmale Linie zu verstärken, aber gelegentlich weist er an der Außenseite der Zellwand ein diffuses Material nach, welches dem nach der Lysozymeinwirkung noch zurückgebliebenen, der Zellwand anhaftenden Kapselpolypeptid entspricht. Da die deutliche Verstärkung der Zellwand nur durch den Polysaccharidantikörper des Bac. «M» und nicht den des Bac. megatherium hervorgerufen wird, handelt es sich hier um eine *spezifische Zellwand-Reaktion*. Mit Hilfe dieser Reaktion ist es möglich geworden, die vermutete Polysaccharid-Natur der Bakterienzellwand zu beweisen.

Welshimer und Robinow (6) konnten bei B. megatherium ohne Lysozym-Einwirkung das Anfangsstadium der Ablösung der Zellmembran von der Zellwand stellenweise beobachten und die Zellwand färberisch darstellen. Während der Lysozymeinwirkung haben sie diese Trennung sowie die sphärische Umwandlung des Plasmas nicht beobachtet, vielleicht deswegen, weil ihre Bakterien zuerst mit Formalin behandelt und weil sie mit fortschreitender Lysozymwirkung nur undeutlich zu färben waren. Im Folgenden wollten wir zusätzliche Informationen über die eigenartige sphärische Umwandlung des Bakterienplasmas erhalten.

Zuerst schien es wünschenswert abzuklären, ob die sphärische Umwandlung auch dann erfolgt, wenn die Bakterien an Stelle des

Eiklars mit reinem Lysozymferment behandelt werden. Wir stellten reines Lysozym nach dem Absorptionsverfahren von *Fevold* und *Aldeston* (11) aus Eiklar her. Die nach diesem Verfahren isolierte weiße pulverförmige Substanz ist in Wasser leicht löslich; 20 mg dieser Substanz in 10 ccm phys. NaCl gelöst wurde als 1 : 500 Verdünnung bezeichnet. Wenn die Verdünnungen 1 : 500 bis 1 : 80 000 mit dem gleichen Volumen einer dichten Bakterien-suspension vermischt wurden, kam bei Zimmertemperatur innerhalb einiger Stunden eine vollkommene Aufhellung der Bakterien-suspension zustande. Bei höheren Konzentrationen des gereinigten Lysozyms konnte somit keine Hemmungszone beobachtet werden. Die Titration der Aktivität des gereinigten Lysozyms wurde mit vier verschiedenen Bakteriensuspensionen durchgeführt, deren Dichte in Zweierpotenzen abnahm. Der Trübungsgrad der Bakteriensuspensionen wurde im Klett-Summerson Photometer mit Blaufilter Nr. 2 nach Abzug der Leerwerte ermittelt.

Der Titer der Lysozymwirkung gegenüber einem empfindlichen Bakterium ist, wie bekannt, außer der Temperatur und Zeit an erster Stelle von der Dichte der Bakteriensuspension abhängig. Je nach Dichte der Bakteriensuspension war der Titer, sowohl betreffs der vollkommenen Auflösung (mikroskopisch nur Zelltrümmer) als auch der sphärischen Umwandlung verschieden. Bei der Bakteriensuspension mit einem Photometerwert 144 konnte auch noch bei einer Verdünnung 1 : 82 000 000 des gereinigten Lysozyms eine deutliche sphärische Transformation des Bakterienplasmas bei erhaltenen Kapselstrukturen und Kettenverbänden beobachtet werden.

TABELLE I.

Aktivität des gereinigten Lysozyms gegenüber verschieden dichten Suspensionen des *Bac. «M»* bei 24° C 5 Stdn.

Bakterien-Suspension (Photometer-Wert)	Verdünnungen des Lysozyms in Tausend									
	160	320	640	1280	2560	5120	10 240	20 480	40 960	82 000
400	c	[c]	st	(w)	w	m	w	w	Sp	Sp
245	c	c	[c]	m	w	w	w	(w)	0	0
144	c	c	c	c	c	[c]	c	st	w	(w)
77	c	c	c	c	c	c	c	[c]	c	(st)

Grad der Auflösung: c = komplett; st = stark; m = mittel; w = wenig; Sp = Spur.

Mikroskopische Untersuchung: [] = nur Zelltrümmer; () = Grenze der sphärischen Umwandlung.

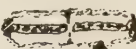
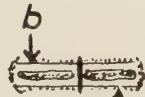
Weiter wurde untersucht, inwiefern die sphärische Umwandlung des Bakterienplasmas durch Koagulation der Proteine verhindert werden kann. Bac. «M» wurde auf Gladstone-Fildes Agarnährboden bei 30° C während 24 Std. gezüchtet, die Bakterien mit phys. NaCl-Lösung abgewaschen und die Suspension mit etwa 245 Photometer Trübungsgrad in zwei Teile geteilt. Ein Teil wurde 30 Minuten im kochenden Wasserbad gehalten, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt. Beide Suspensionen wurden parallel mit 1 : 10, 1 : 100 und 1 : 1000 Eiklarverdünnungen bei Zimmertemperatur gehalten. Die nach verschiedenen Zeitintervallen entnommenen Proben wurden mit unverdünntem Polysaccharid-Antiserum vermischt und sofort im Phasenkontrastmikroskop untersucht.

Wie aus Tabelle II ersichtlich, konnte die sphärische Umwandlung der nicht gekochten Bakterien regelmäßig beobachtet werden. Die Reihenfolge der Veränderung der Zellstruktur kann schematisch folgenderweise zusammengefaßt werden:

1. Dehnung der Zellwand — vermutlich durch eine initiale Spaltung der großen Polysaccharid- oder komplexerer Polysaccharid enthaltender Moleküle.
2. Parallel mit der fortschreitenden Erweiterung der Zellwand beginnt die sphärische Umwandlung des Bakterienplasmas.
3. Die Polysaccharid-Struktur der Kapsel verschwindet allmählich, und gleichzeitig geht auch das Kapselpolypeptid größtenteils in Lösung.
4. Die resistentesten Elemente der Kapselstruktur sind die transversalen Septa, die die Fortsetzung der Querwand des Zellverbandes («cross-wall» nach *Knaysi*) bilden sowie die Verstärkungen am Ende der Kette. Selbst diese verschwinden aber in einer Zeit, wo die spezifische Zellwand-Reaktion noch ganz deutlich ist. Die Starrheit der Zellwand nimmt aber ab; Strömungen im Präparat, bzw. Druck auf das Deckglas, rufen deutliche Torsionen hervor.
5. Die sphärische Umwandlung des Plasmas wird vollendet. Es entstehen auffallend regelmäßige Kugelformen mit ganz homogenem, im Phasenkontrastmikroskop schwarz erscheinendem Inhalt. Manche dieser Kugeln zeigen kurz nachher eine Aufhellung des Inhaltes.
6. Die Zellwand wird aufgelöst und die kugelförmigen, nun meist leeren Elemente werden freigesetzt. Die Plasmamembran scheint erhalten geblieben zu sein, und sie zeigt einige Körnchen oder bei den durch Strömung gedrehten Kugeln stechapfelförmige Ausstülpungen.
7. Die kugelförmigen Elemente zerfallen und lassen im

TABELLE II.

Zeitlicher Verlauf der strukturellen Änderungen bei Zimmertemperatur.

Lebende Bakterien	Eiklarverdünnung					Gekochte Bakterien	Eiklarverdünnung					
	1:10	1:100	1:1000				1:10	1:100	1:1000			
				5'						1'	5'	
												
												
												
												
												
				4'	10'	6Std.				10'	20'	6Std.
				5'	5Std. > 6Std.					27Std.	24Std.	

a = Polysaccharid-Kapselstruktur.

b = Zellwand.

c = Plasma.

Phasenkontrastmikroskop sichtbare, aber präzipitatähnliche, formlose Trümmer zurück.

Nach Aufkochen der Bakteriensuspension ist die Kapsel etwas geschrumpft; die Bakterienzelle ist auch dünner und zeigt eine körnige Struktur. Im Laufe der Lysozymwirkung konnten im wesentlichen die gleichen Veränderungen beobachtet werden, mit Ausnahme der sphärischen Umwandlung des Plasmas. Die Bakterienzelle wird, infolge der Hitzeoagulation der Plasmaproteine,

in der gleichen Form wie nach dem Erhitzen stabilisiert, da wegen der Koagulation der Plasmaproteine ihre Gestalt nicht mehr durch die Eigenschaften der Zellmembran und durch Oberflächenkräfte bestimmt wird. Nach längerer Lysozym-Behandlung werden die Zellen etwas heller. Mit gekochten Bakterien kann die Auflösung des Kettenverbandes der Bakterien besser beobachtet werden, da die in der Stäbchenform fixierten Bakterien erhalten bleiben. Wenn die Bakteriensuspension nicht allzu dicht ist, löst das Eiklar bis zu einer Verdünnung von 1 : 10 000 oder höher den Kettenverband der Bakterien auf. Die freigewordenen Stäbchen lassen sich selbst nach 27 Stunden mikroskopisch fast unverändert nachweisen und zeigen im Gegensatz zu jenen Suspensionen, wo die Kettenverbände nicht aufgelöst werden, geringe Tendenz zur Sedimentation.

Die lysozymbedingte sphärische Transformation kann auch durch Zugabe von Formalin zur Bakteriensuspension unterdrückt werden. 1,9% Formalingehalt der Bakteriensuspension ist bereits genügend, um die sphärische Umwandlung zu verhindern. Mit zunehmender Formalinkonzentration geht aber der Lysozymtiter beträchtlich zurück. Bei 19% Formalinkonzentration werden die Kettenverbände nur bis 1 : 80 Verdünnung des Eiklars aufgelöst. Wenn die Bakterien nach der Formalinbehandlung mit Phosphatpuffer gewaschen werden (6), hebt eine ursprünglich 1,9% Formalinkonzentration die sphärische Umwandlung nicht mehr auf. 6,3 bzw. 19% ursprüngliche Formalinkonzentrationen wirken hingegen auch nach dem Waschen hemmend; sie erlauben jedoch die Auflösung des Kettenverbandes bis 1 : 1280 Eiklarverdünnung.

Es ist noch abzuklären, welche anderen Faktoren außer dem Lysozym die sphärische Umwandlung des Bakterienplasmas, die in unserem Institut durch *H. Staehelin* sogar bei *Bac. anthracis* unter gewissen Umständen beobachtet wurde, hervorrufen können.

Literatur.

1. A. Fleming: Lancet 1, 217 (1929). — 2. O. Nakamura: Zschr. f. Immunforsch. 38, 425 (1923). — 3. K. Meyer, J. W. Palmer, R. Thompson und D. Khorazo: J. of Biol. Chem. 113, 479 (1936). — 4. R. R. Feiner, K. Meyer und A. Steinberg: J. of Bact. 52, 375 (1946). — 5. M. Webb: J. of gener. Microbiol. 2, 260 (1948). — 6. H. J. Welshimer und C. F. Robinow: J. of Bact. 57, 489 (1949). — 7. J. Tomcsik: Experientia 7, 459 (1951). — 8. J. Tomcsik und S. Guxer-Holzer: Schweiz. Zschr. Path. u. Bakt. 14, 515 (1951). — 9. J. Tomcsik: Schweiz. Zschr. Path. u. Bakt. 12, 489 (1949). — 10. J. Tomcsik: Schweiz. Zschr. Path. u. Bakt. 13, 616 (1950). — 11. H. L. Fevold und G. Alderton: Biochem. Prep. 1, 67 (1949, New York, John Wiley and Sons Inc.).

Curriculum vitae.

Am 29. Januar 1927 wurde ich, Susanne Guex-Holzer, von Basel, als Tochter des Oskar Holzer, Lehrer, und der Lydia Holzer-Nydegger in Sutz-Lattrigen, Kt. Bern, geboren.

Nach 4jähriger Primarschulzeit und 2jährigem Besuch der Sekundarschule trat ich 1939 in das städtische Gymnasium Biel ein, wo ich im Herbst 1945 das Maturitätsexamen (Typ. B) bestand.

Im gleichen Jahre immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und besuchte dort im Verlaufe meiner naturwissenschaftlichen Studien Vorlesungen und Kurse folgender Herren Professoren und Dozenten: H. Erlenmeyer, P. Huber, A. Portmann, M. Geiger-Huber, E. Miescher, W. Kuhn, F. Speiser, P. Buchner, H. Zickendraht, L. Vonderschmitt, T. Reichstein, R. Wizinger, J. Tomcsik, C. Grob, E. Schlittler, M. Brenner. Allen diesen Herren möchte ich für ihre Bemühungen bestens danken.

Im Herbst 1950 begann ich unter der Anleitung von Herrn Professor J. Tomcsik die hier vorliegende Dissertation, die ich zu Beginn des Sommersemesters 1953 abschließen konnte. Neben den Vorexamen in anorganischer und organischer Chemie habe ich im Verlaufe meines Chemiestudiums die Nebenfachexamen in physikalischer Chemie, Botanik und Bakteriologie bei den Herren Professoren W. Kuhn, M. Geiger-Huber und J. Tomcsik bestanden.

Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. J. Tomcsik, aussprechen.

